通知法収載

Loopamp®

LAMP（Loop-mediated Isothermal Amplification）法

クリプトスポリジウム検出試薬キット
ジアルジア検出試薬キット
試薬操作マニュアル

2012年8月改訂

「水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための検査方法の見直し等について」（平成24年3月2日付け健水発0302第2～4号　厚生労働省健康局水道課長）にて、「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について」（平成19年3月30日付け健水発第0330006号　厚生労働省健康局水道課長通知）が一部改正され、LAMP法が収載されたことが通知されました。

栄研化学株式会社

≪目次≫

検査の概要 ・・・・・・・・・・・ P.3

必要な器具類 ・・・・・・・・・・・ P.4

試薬の調製 ・・・・・・・・・・・ P.5

サンプル処理の概略 ・・・・・・・・・・・ P.6,7

サンプル処理の詳細 ・・・・・・・・・・・ P.8

LAMP法の概略 ・・・・・・・・・・・ P.9

LAMP法の詳細 ・・・・・・・・・・・ P.10,11

操作上の注意点 ・・・・・・・・・・・ P.12,13

参考情報 ・・・・・・・・・・・ P.14,15

1. 検水由来の阻害対策 ・・・・・・・・・・・ P.14

2. オーシスト・シストと磁気ビーズの塩酸解離操作 ・・・・ P.15

≪検査の概要≫

◆本製品の概要

本キットは、*Cryptosporidium*属 、*Giardia*属の保持する18S rRNAをコードする遺伝子の核酸配列を認識するプライマーを用いて、LAMP法による核酸の増幅反応を行い、その増幅の有無から特異的に*Cryptosporidium*属 、*Giardia*属を検出するためのキットです。

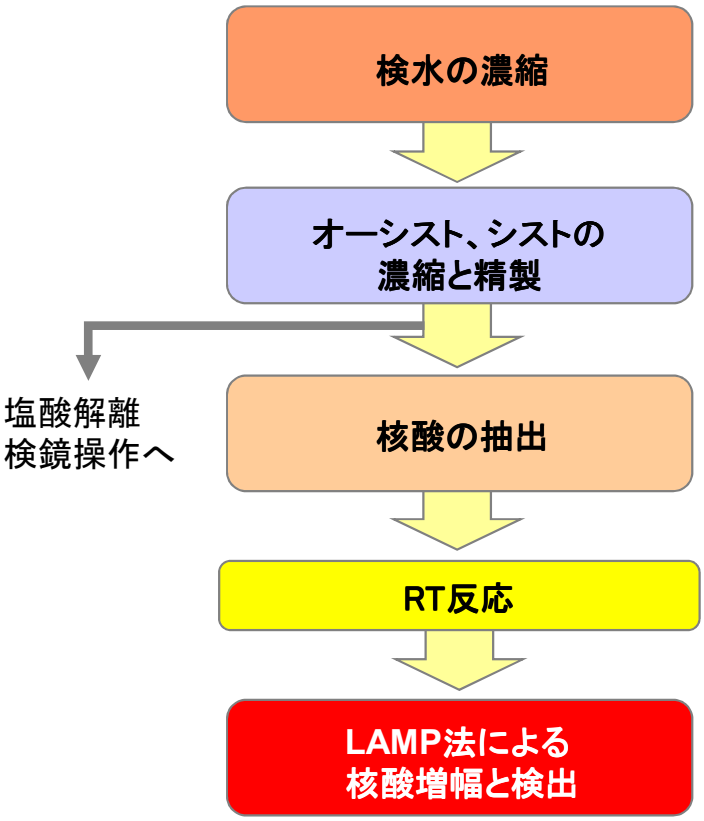
まず、磁気ビーズ法等でオーシスト･シストを精製します。磁気ビーズオーシスト複合体からDNAを抽出し、これをサンプルとして、本キットによってDNAを増幅、1～1.5時間以内に検出します。

検鏡操作なしに、短時間に*Cryptosporidium*属 、*Giardia*属を検出することができます。

◆本製品の特徴

- クリプトスポリジウム、ジアルジアの遺伝子を検出する遺伝子検査試薬です。顕微鏡による形態学的検査法とは異なり、遺伝子の有無でクリプトスポリジウム、ジアルジアを検出します。
- LAMP法による効率の良い遺伝子増幅により、短時間にしかも特異的にクリプトスポリジウム、ジアルジアを検出することができます。
- 専用のリアルタイム濁度測定装置を用いて、増幅から検出までを1ステップ（閉鎖系）で行います。そのため、コンタミネーションのリスクを低減することができます。

◆簡易フローチャート



免疫磁気ビーズによって、濃縮検水中の原虫（オーシスト、シスト）を捕捉し、濃縮および精製を行います。

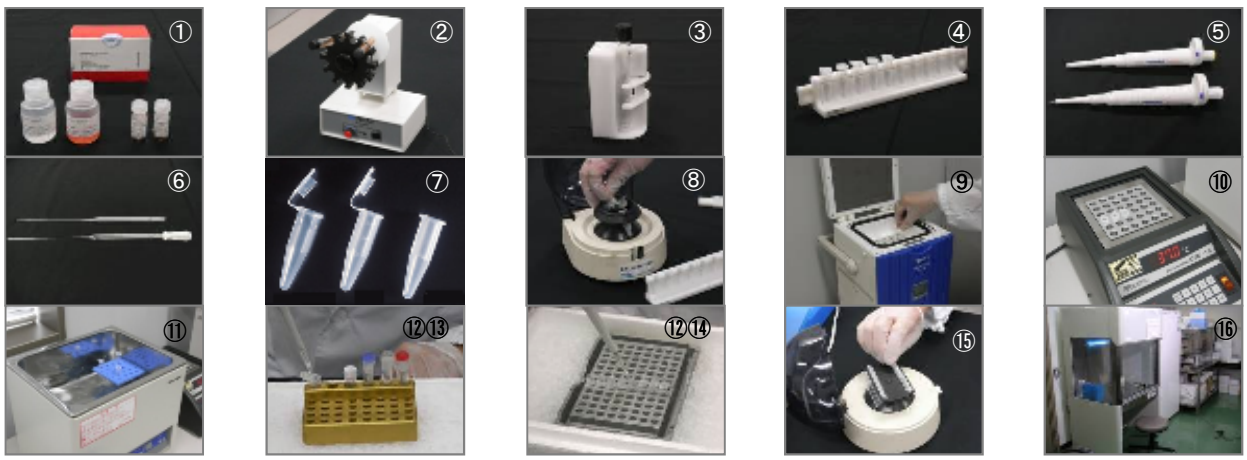
凍結融解および酵素反応によって、オーシストおよびシストを破砕し、核酸（DNA、RNA）を遊離させます。

RT（逆転写）反応を行うことで、RNAからcDNAを合成します。
（＊： ジアルジア検出の場合は不要）

上記抽出液をサンプルとし、Loopamp検出試薬キットを使用してcDNAおよびDNAの増幅、検出を行います。

≪必要な器具類≫

	器具名称	用途	使用ステップ		
			オーシスト、シストの濃縮と精製	核酸の抽出、RT反応	LAMP試薬操作
①	免疫磁気ビーズ （例：Dynabeads GC-Combo ）	オーシスト、シストを捕捉するための磁気ビーズを含む試薬	○		
②	回転ミキサー	レイトンチューブを回転させるためのミキサー	○		
③	レイトンチューブ および 磁気ビーズ用磁石	磁気ビーズ専用のガラスチューブと専用の磁石付のホルダー	○		
④	磁気ビーズ用 マイクロチューブ立て	1.5mLマイクロチューブの磁気ビーズ捕捉に使用	○		
⑤	可変式マイクロピペット および適合チップ	試薬の調製、分注に使用	○	○	○
⑥	パスツールピペット	濃縮検水をチューブに移す際に使用	○		
⑦	1.5mLマイクロチューブ			○	○
⑧	微量簡易遠心機 （1.5mLチューブ用）	1.5mLチューブのスピンダウン用		○	○
⑨	-80℃フリーザー （ドライアイス＋アセトンでも代用可）	オーシスト、シストの破砕に使用		○	
⑩	ヒートブロック	オーシスト、シストの破砕に使用		○	
⑪	超音波洗浄機	オーシスト、シストの破砕に使用		○	
⑫	アイスボックスおよび クラッシュアイス	抽出サンプル溶液の冷却、 試薬の冷却に使用		○	○
⑬	アルミラック （2mLチューブ用）	抽出サンプル溶液の冷却、 試薬の冷却に使用		○	○
⑭	アルミラック （0.2mLチューブ用）	試薬の冷却に使用			○
⑮	微量簡易遠心機 （0.2mL8連チューブ用）	反応チューブのスピンダウン用			○
⑯	クリーンベンチ	試薬調製に使用。クリーンな環境を作る			○



≪試薬の調製≫

1. オーシスト、シストの濃縮と精製用

◆ 免疫磁気ビーズ（Dynabeads GC-Combo（株式会社ベリタス）を推奨）

製品コード	製品名	梱包単位	保存温度
DB73002	Dynabeads GC-Combo	1 kit（10tests）	冷蔵（2～8℃）
DB73012	Dynabeads GC-Combo	1 kit（50tests）	冷蔵（2～8℃）

取扱説明書に従い試薬を調製してください。

◆ 誘出液（1%PET溶液）

誘出液原液（PET原液）を精製水で100倍希釈して使用します。

＊誘出液原液（PET原液）の組成

試薬	1L中の組成
ピロリン酸ナトリウム・10水塩	20g
EDTA3Na	30g
Tween80	10g

＊精製水約800mL に左記試薬を溶解し、1N HClまたは1N NaOHを用いてpH7.4に調製したのち、精製水にて1Lにメスアップする。

2. 核酸抽出用

◆ 1×Proteinase K溶解液

必要量を調製し、小分け分注して－20℃に保存します。
－20℃の凍結保存で1ヵ月安定、20回まで凍結融解が可能です。

試薬	終濃度	1 test分の用量	試薬メーカー
600mAU/mL Proteinase K	1.5mAU/mL	0.125μL	QIAGEN社（指定）
1M NaCl	20mM	1.00μL	和光純薬　等
10% Triton X-100	0.1%	0.50μL	和光純薬　等
1M DTT	2mM	0.10μL	ナカライテスク　等
TE（Tris EDTA pH8.0）		48.275μL	ナカライテスク　等
合　計		50μL	

3. RT反応用

◆ RT（逆転写）反応用試薬（例：PrimeScript® RT Master Mix（タカラバイオ））

取扱説明書に従い試薬を調製してください。

4. LAMP反応用

◆ LAMP法試薬

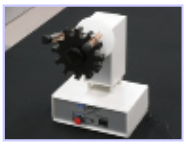
Loopampクリプトスポリジウム検出試薬キット、Loopampジアルジア検出試薬キット

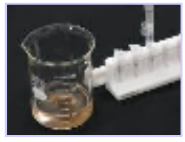
調製方法は、9ページをご参照ください。

≪サンプル処理の概略 ≫

《Dynabeads GC Comboの場合》

オーシスト、シストの濃縮と精製





レイトンチューブ

10×バッファーA（原液）1mL
10×バッファーB（原液）1mL

濃縮試料を全て入れる （洗いながら回収）

Dynabeads anti-Cryptosporidium 100μL
Dynabeads anti-Giardia 100μL

回転ミキサーにて1時間

磁気ビーズ用磁石 / レイトンチューブ

ゆっくりと横転し混和 1回/秒 2分間

磁気ビーズ用磁石 / レイトンチューブ

パスツールピペットにて上澄み液を捨てる

誘出液（PET）で十分洗浄を行う（計5回）
①②10mL×2回（磁石外さず）
③④ 2mL×2回（磁石外し再懸濁）
⑤ 10mL×1回（磁石外さず）

磁石からレイトンチューブを外す

レイトンチューブ

1×バッファーA液（10倍希釈液） 1mL

上澄みをレイトンチューブに移し、チューブ内を洗い、マイクロチューブに戻す（3回繰り返し）

ビーズを静かに混和して再懸濁

全量をマイクロチューブに移す

1.5mL マイクロチューブ

磁気ビーズ用チューブラック / 1.5mL マイクロチューブ

転倒混和（180度） 1回/秒 1分間

磁気ビーズ用チューブラック / 1.5mL マイクロチューブ

マイクロピペットで上澄みを捨てる

＊上澄みを出来るだけ取り除く

ラックからマイクロチューブを外す

1.5mL マイクロチューブ

スピンダウン

さらにピペットで上澄みを捨てる

＊すぐに核酸抽出しない場合は、
この時点で凍結保存
＊塩酸解離を行う場合はP15を参照

凍結融解（-80℃⇔37℃など） 5回繰り返し

核酸の抽出

1.5mL マイクロチューブ

1×Proteinase K 溶解液 50μL 添加

60℃ 30分間 インキュベート
超音波処理 2分間
75℃ 10分間 インキュベート
95℃ 5分間 インキュベート

＊各ステップで必ずスピンダウンする

1.5mL マイクロチューブ

RT反応 → LAMP法へ

氷上冷却

＊RT反応はジアルジア検出の場合は不要

≪サンプル処理の概略 ≫

● Loopamp クリプトスポリジウム検出試薬キットを使用する場合

RT反応

1.5mL
マイクロチューブ

RT反応用試薬　添加
（例：PrimeScript ® RT Master Mix
（タカラバイオ）のMaster Mix 2μL、
RNase free dH_2O 5μL）

抽出試料を3μL添加

37℃　15分間　インキュベート

85℃　5秒間　インキュベート

＊各ステップで必ずスピンダウンする

1.5mL
マイクロチューブ

氷上冷却

LAMP法へ

＊ 参考文献

Inomata, A., et al. : Development and evaluation of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and high-sensitive detection of *Cryptosporidium* in water samples, Water Sci. Technol., Vol.60, 2167-2172 (2009)

≪サンプル処理の詳細≫

1．オーシスト、シストの濃縮と精製

濃縮した検水を、免疫磁気ビーズ（Dynabeads GC-Comboを推奨）を用いて、磁気ビーズにオーシストおよびシストを捕捉します。操作内容は検鏡法を行う場合とほぼ同じですが、特に核酸抽出反応およびLAMP反応の阻害物質の持込みを防ぐため、洗浄を十分に行ってください。

（LAMP法に用いる場合は、磁気ビーズオーシスト複合体の塩酸解離を行いません。）

1. 回転ミキサーにて1時間攪拌し、ビーズにオーシスト･シストを捕捉後、マイクロビーズ用磁石にレイトンチューブをセット、ゆっくりと混和します。（横に倒す→立てる操作を、1回/秒くらいの速度で2分間行います。）
2. パスツールピペットにてレイトンチューブ内の上澄み液を捨てます。
3. 誘出液（1%PET） 2mLを加え、レイトンチューブ内部を洗浄後、パスツールピペットにて上澄み液を捨てます。そして濁質が無くなるまで洗浄を繰り返します（磁石を外さず10mLのPETで2回、磁石を外して再懸濁しながら2mLのPETで2回、そして磁石を外さず10mLのPETで1回洗浄）。洗浄を徹底してください。

以後の操作は、通常の操作と同様です。

（操作概略をP.6に記載しておりますが、詳細は「日本水道協会発行　クリプトスポリジウム　－解説と試験方法－ 」をご参照ください）

2．核酸の抽出

1. 磁気ビーズ用マイクロチューブラックから、マイクロチューブを外し、スピンダウンします。
2. ピペットを用いて、マイクロチューブ内の上澄み液を完全に捨てます。
3. マイクロチューブの凍結融解（－80℃で約1分間⇒37℃で約1分間など）を5回繰り返します。
   ＊温度によって凍結融解に要する時間は異なりますので、適宜時間を調整してください。
4. マイクロチューブに1×Proteinase K 溶解液を50μL添加し、タッピングにて混和します。
5. 60℃で30分間インキュベートします。
6. スピンダウン後、超音波洗浄機を用いて、超音波処理を2分間行います。
7. スピンダウン後、75℃で10分間インキュベートします。
8. LAMP法に供する前に、95℃で5分間インキュベートを行い、氷上で保存します。

3．RT反応

1. 別途マイクロチューブを用意し、RT用試薬（例：PrimeScript® RT Master Mix（タカラバイオ）のMaster Mix 2μL、RNase free dH_2O 5μL）を添加します。
2. 抽出されたサンプル溶液3μLを添加し、タッピングにて混和します。
3. 37℃で15分間インキュベートします。
4. スピンダウン後、85℃で5秒間インキュベートし、LAMP法に供するまで氷上で保存します。

◆ 核酸抽出時のポイント

- 温度および時間を守り、操作ごとに必ずスピンダウンをしてください。
- 1×Proteinase K溶解液は、調製後凍結保存してください。
- マイクロチューブから上澄みを除去する場合は、マイクロピペットにて出来るだけ除去してください。
- サンプル処理の途中で保存する場合は、核酸の抽出操作2番（マイクロチューブから上澄みを除去後）で操作を止め、凍結保存してください。

≪LAMP法の概略≫

◆ キット内容

Loopamp クリプトスポリジウム検出試薬キット

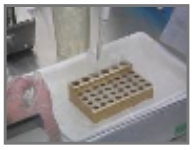
Loopamp ジアルジア検出試薬キット

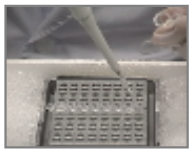
クリプトスポリジウム検出試薬キット	ジアルジア検出試薬キット	備考
(1) 2×Reaction Mix.(RM)	(1) 2×Reaction Mix.(RM)	増幅のための基質等を含む試薬
(2) Primer Mix. Cry (PM Cry)	(2) Primer Mix. Gia (PM Gia)	ターゲットに特異的なLAMP法プライマー
(3) Distilled Water (DW)	(3) Distilled Water (DW)	遺伝子検査用蒸留水
(4) *Bst* DNA Polymerase	(4) *Bst* DNA Polymerase	鎖置換型DNA合成酵素
(5) Positive Control Cry (PC Cry)	(5) Positive Control Gia (PC Gia)	陽性コントロール

※本キットは環境分析を目的とした検査にのみご使用ください。人、動物由来検体の医療、臨床診断の目的では使用できません。

◆ 試薬操作の概略

マスターミックスの調製





マスターミックスの調製

	≪ 1test分≫	≪10test分≫
2×Reaction Mix.(RM)	12.5μL	125μL
Primer Mix. Cry (PM Cry) もしくは Primer Mix. Gia (PM Gia)	2.5μL	25μL
Bst DNA Polymerase	1.0μL	10μL
Distilled Water(DW)	4.0μL	40μL
Total	20.0μL	200μL

＊必要なテスト数分調製(コントロール反応分も含む)

マスターミックス　20μLずつを分注

サンプル添加

反応チューブ ← RT反応＊ ← 1.5mLマイクロチューブ 抽出されたサンプル溶液

サンプル溶液　5μLを添加

＊RT反応はジアルジア検出の場合は不要
＊陰性コントロールはDW、陽性コントロールはPCを5μL添加

混和、スピンダウン後
リアルタイム濁度測定装置にセット

増幅反応

リアルタイム濁度測定装置で増幅反応

63℃　60分間

結果判定

≪LAMP法の詳細≫

LAMP反応は非常に鋭敏な反応であり、鋳型となるDNAがごく微量でも混入すると誤った結果をもたらす原因となります。このようなコンタミネーションを防ぐために、試薬の調製およびサンプル溶液等の添加は下記の点に注意してください。

・クリーンベンチ等を使用し、作業中は手袋を着用する。
・クリーンベンチ等で使用するピペットはそれぞれ専用のものとする。

1. マスターミックスの調製

1. −20℃で保存していたキット試薬を室温で解凍し、使用するまで氷上で保存します。
2. 1.5mLマスターミックス調製用滅菌チューブ（別途用意）に、下記試薬をそれぞれ必要な検体数分と陽性・陰性コントロール分を分注してタッピング、転倒混和あるいはボルテックスミキサー（1秒間×3回）により十分混合した後、スピンダウンし、マスターミックスとします。

   なお作製したマスターミックスはすぐに使用してください。

2. マスターミックスの分注およびサンプル溶液の添加

1. 試薬調製用のクリーンベンチ内でLoopamp反応チューブにそれぞれマスターミックスを20μLずつ分注します。
2. 抽出およびRT反応（クリプトスポリジウムの場合のみ）したサンプル溶液5μLを添加し、キャップを閉めます。
3. 陰性コントロールとしてDistilled Water（DW）、陽性コントロールとしてPositive Control Cry（PC Cry）5μLもしくはPositive Control Gia(PC Gia) 5μL添加し、キャップを閉めます。
4. タッピング等で混和した後、スピンダウンします。

3. LAMP反応による増幅反応および検出

1. リアルタイム濁度測定装置の電源を入れます。
2. 測定条件を設定し、測定可能温度まで加熱します。
3. 測定可能温度に達したことを確認の上、反応チューブを反応ブロックにセットして、ホットボンネットカバー（増幅ユニットの蓋）を閉めてください。
4. 測定を開始します。
5. 反応チューブそれぞれの濁度を測定し、モニターに増幅曲線を表示します。

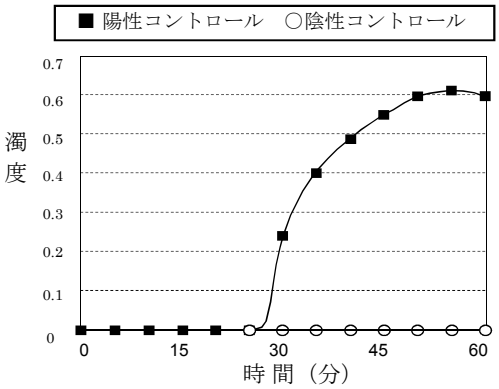
◆ LAMP法試薬操作時のポイント

- 反応チューブは、必ず専用のLoopamp反応チューブをお使いください。
- 反応前にチューブにヒビ・キズ等がないことを確認してください。
- チューブを検出部に入れる際は、チューブ内に大きな気泡がないことを確認してください（気泡があると、誤った判定の原因となります）。
- 反応後のチューブを検出部から取り出す際はチューブを破損しないように慎重に取り扱ってください。
- 反応後の反応チューブのキャップは、決して開けないでください。増幅産物によるコンタミネーションは誤判定の原因となる可能性があります。

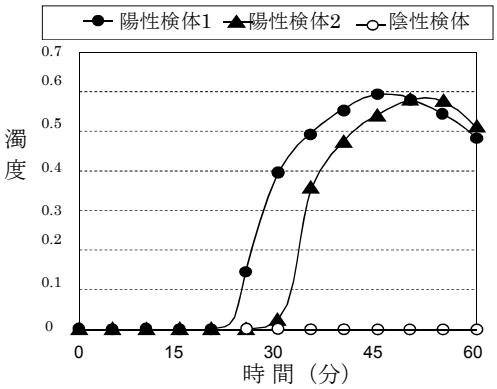
≪LAMP法の詳細≫

4. 結果判定

増幅曲線において、濁度が上昇している場合を陽性と判定します。



コントロール増幅曲線パターン



検体増幅曲線パターン

◆ 結果判定時のポイント

・判定の際には、陽性コントロール、陰性コントロールの反応が適切に進行していること（増幅曲線において、陽性コントロールで濁度が上昇し、陰性コントロールでは濁度が上昇していない）を確認してください。

・リアルタイム濁度測定装置の結果判定機能は、陽性/陰性を確定するものではなく、判定を補助するためのものです。結果判定は、増幅曲線における濁度上昇の確認によって行ってください。

≪操作上の注意点≫

1. バイオハザード対策

◆ 検査対象物は病原微生物を含んでいる可能性があるため、検査実施の際にはそれを念頭においた操作を行ってください。

⇒ 安全キャビネットを使用する。

⇒ 必ずマスクや手袋を使用する。

2. 核酸分解酵素（DNase、RNase）のコンタミネーション

◆ DNase、RNaseは生体の細胞や分泌液等に含まれており、サンプル内に混入すると、遺伝子が分解され、結果として偽陰性を引き起こすことがあるので、注意が必要です。

⇒ DNase、RNaseフリーのチューブ等を使用し、器具類は滅菌する。

⇒ 必ずマスク・手袋を使用し、検査担当者からのDNase、RNaseの混入を防ぐ。

3. 遺伝子のコンタミネーション

◆操作環境で遺伝子の混入を防ぐため、以下の点に注意してください。

遺伝子混入を防ぐ環境を整える。

⇒ 作業領域を区別する。器具を作業領域専用にする。

⇒ 作業後、次亜塩素酸による清掃を行い、可能であれば紫外線照射を行う。

操作中におけるクロスコンタミネーションを防ぐ。

⇒ フィルター付チップを使用する。

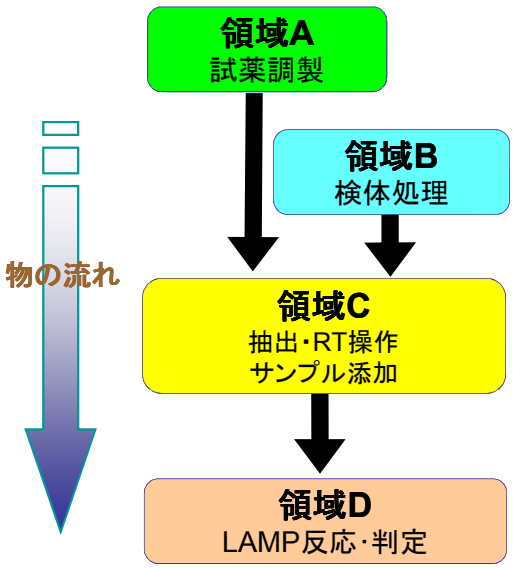
増幅産物からの遺伝子コンタミネーションを防ぐ。

⇒ 反応後のチューブのキャップを開けない。

⇒ 反応後のチューブをオートクレーブにかけない。

1）作業領域の区分

各作業における遺伝子のコンタミネーションを防止するために、作業ごとに操作する領域を区分けします。
遺伝子の濃度及び生物学的危険度（バイオハザードレベル）により作業領域を区分けします。



器具類は基本的に各領域専用とする。
やむを得ずラックなどを領域外に移動させる場合は、
領域A⇒B⇒C⇒Dの一方向のみとする。

領域A

試薬調製
遺伝子、バイオハザード共に汚染度が最も低い領域。
◆クリーンベンチ
◆試薬調製専用の検査室
◆試薬調製専用の作業台

領域B

検体取り扱い操作
遺伝子汚染度は低いが、バイオハザード汚染度が最も高く、検体からの感染を防止するための領域。
◆生物学用安全キャビネット
◆検体取り扱い専用の検査室
◆検体取り扱い専用の作業台

領域C

抽出～増幅試薬とサンプル混合操作
遺伝子汚染度は領域Bと大きく変わらないが、生物学的汚染度が領域Bより低い領域。
◆抽出専用の作業台
◆サンプル添加用の安全キャビネット

領域D

遺伝子増幅（増幅機器設置場所）
遺伝子汚染度が最も高く、他作業への遺伝子コンタミネーション防止のための領域。
◆遺伝子増幅機器を設置する検査室

2）増幅産物の取り扱いについて

LAMP反応によって増幅された遺伝子増幅産物は、通常の遺伝子増幅法に比して非常に多く、コンタミネーションを引き起こす原因となります。

増幅産物の取扱いに関しては、以下の点にご注意ください。

- 増幅反応後のチューブのフタは、絶対に開封しない。
- 増幅反応後のチューブは、決してオートクレーブにかけず、産廃処理など施設の基準に則り廃棄する。
- 増幅産物の電気泳動は行わない。
- 増幅産物の取扱いは領域Dのみとし、他の領域には持ち込まない。

≪参考情報≫

1. 検水由来の阻害対策

検水由来のLAMP反応阻害物質の影響を軽減する目的で、サンプル量を減らして測定することができます。

Loopamp クリプトスポリジウム検出試薬キット

マスターミックスの調製

	≪ 1test分≫	≪10test分≫
2×Reaction Mix.(RM)	12.5μL	125μL
Primer Mix. Cry(PM Cry)	2.5μL	25μL
Bst DNA Polymerase	1.0μL	10μL
Distilled Water(DW)	**7.0μL**	**70μL**
Total	**23.0μL**	**230μL**

＊必要なテスト数分調製(コントロール反応分も含む)

マスターミックス **23μL**ずつを
反応チューブに分注

抽出されたサンプル溶液 → RT反応 → 反応チューブ

サンプル溶液 **2μL**を反応チューブに添加

Loopamp ジアルジア検出試薬キット

マスターミックスの調製

	≪ 1test分≫	≪10test分≫
2×Reaction Mix.(RM)	12.5μL	125μL
Primer Mix. Gia(PM Gia)	2.5μL	25μL
Bst DNA Polymerase	1.0μL	10μL
Distilled Water(DW)	**8.0μL**	**80μL**
Total	**24.0μL**	**240μL**

＊必要なテスト数分調製(コントロール反応分も含む)

マスターミックス **24μL**ずつを
反応チューブに分注

抽出されたサンプル溶液 → 反応チューブ

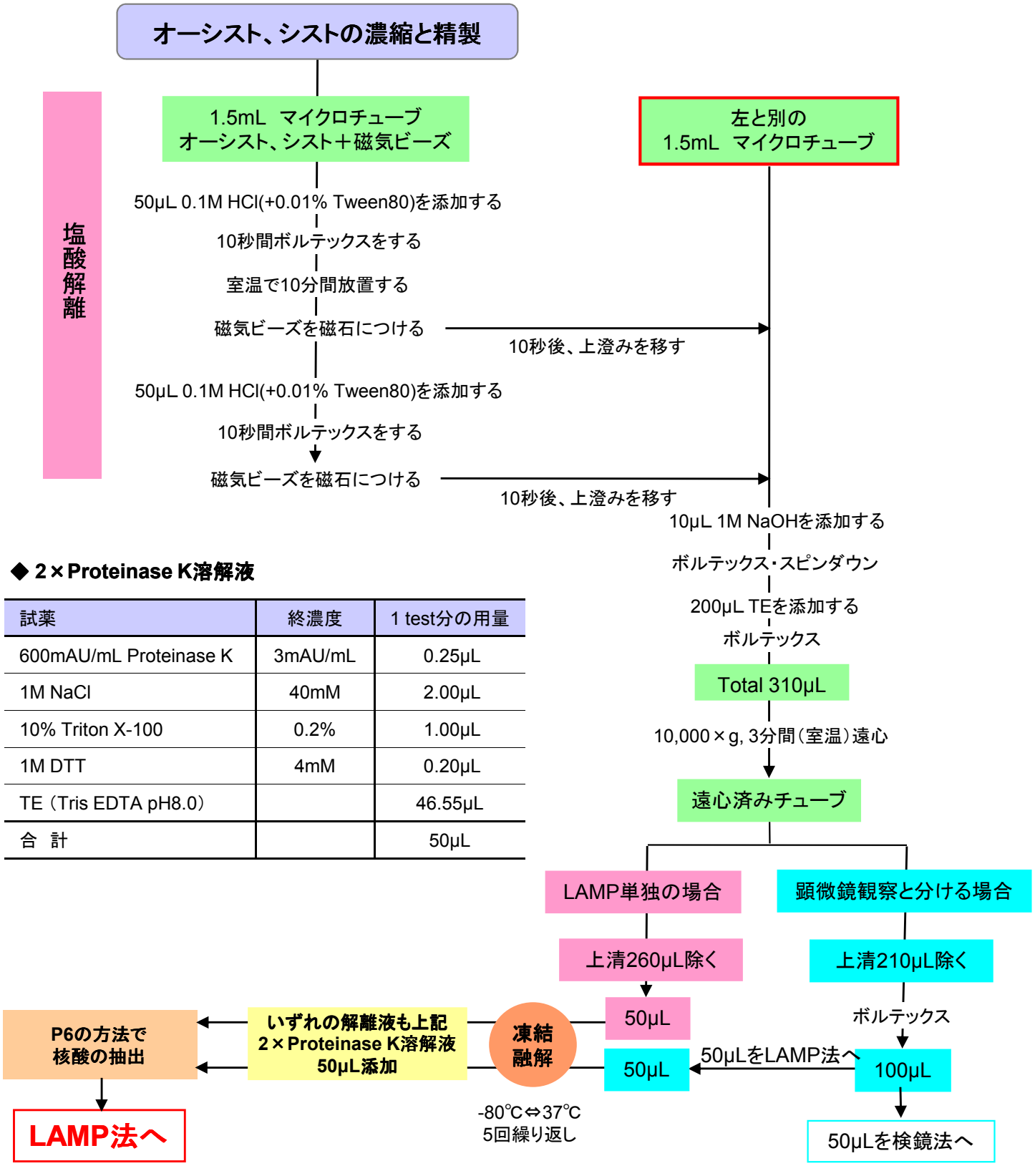
サンプル溶液 **1μL**を反応チューブに添加

◆ 注意事項

・サンプル溶液量を減らす場合も、クリプトスポリジウムの検出では、必ずRT反応を行ってください。

2. オーシスト･シストと磁気ビーズの塩酸解離操作

オーシスト、シストの濃縮、精製後、抽出操作を行う前に塩酸解離し、検鏡法と同じ検体を用いることができます。



◆ 2×Proteinase K溶解液

試薬	終濃度	1 test分の用量
600mAU/mL Proteinase K	3mAU/mL	0.25μL
1M NaCl	40mM	2.00μL
10% Triton X-100	0.2%	1.00μL
1M DTT	4mM	0.20μL
TE（Tris EDTA pH8.0）		46.55μL
合　計		50μL